

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY DOCUMENT**

REC'D	11 MAR 1998
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)
in Braunschweig/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter
der Bezeichnung

"Epothilion E und F"

am 25. Februar 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 D, C 12 P und A 61 K der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 13. Januar 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Hoß

Zeichen: 197 07 506.1

Epothilon E und F

Produktionsstamm:

Der Produktionsstamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wurde im Juli 1985 an der GBF aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi isoliert und am 28.10.91 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter Nr. DSM 6773 hinterlegt.

Die Charakterisierung des Produzenten sowie die Kulturbedingungen sind beschrieben in:

Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel. DE 41 38042 A1, offengelegt am 27. Mai 1993.

Bildung der Epothilone E und F während der Fermentation:

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l Bioreaktor wird mit 60 l Medium (0,8 % Stärke; 0,2 % Glucose; 0,2 % Soyamehl; 0,2 % Hefeextrakt; 0,1 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7,4) gefüllt. Zusätzlich werden 2 % Adsorberharz (XAD-16, Rohm und Haas) zugegeben. Das Medium wird durch Autoklavieren (2 Std., 120 °C) sterilisiert. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium (zusätzlich 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4) in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 Upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührergeschwindigkeit von 500 Upm und einer Belüftung von 0,2 NI pro m³ und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7,4 gehalten. Die Fermentation dauert 7-10 Tage. Die gebildeten Epothilone werden während der Fermentation kontinuierlich an das Adsorberharz gebunden. Nach Abtrennen der Kulturbrühe (z.B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Trockne eingengt und in 700 ml Methanol aufgenommen.

HPLC-Analyse des XAD-Eluates:

Gegenüber dem Ausgangsvolumen des Reaktors (70 l) ist das Eluat 100 : 1 konzentriert.

Die Analyse wird durchgeführt mit einer HPLC Anlage 1090 der Fa. Hewlett Packard.

Zur Trennung der Inhaltstoffe wird eine Microbore Säule (125/2 Nucleosil 120-5 C₁₈) der Fa. Machery-Nagel (Düren) verwendet. Eluiert wird mit einem Gradienten aus Wasser / Acetonitril von anfänglich 75 : 25 bis zu 50 : 50 nach 5,5 Minuten. Dieses Verhältnis wird bis zur 7. Minute gehalten, um dann bis zur 10. Minute auf 100 % Acetonitril anzusteigen.

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 250 nm und einer Bandbreite von 4 nm. Die Dioden Array Spektren werden im Wellenlängenbereich von 200 - 400 nm gemessen.

Im XAD-Eluat fallen 2 neue Substanzen mit R_f 5,29 und R_f 5,91 auf, deren Absorptionsspektren mit denen von Epothilonen A bzw. B identisch sind (Abb. 1; E entspricht A, F entspricht B). Diese Substanzen werden unter den gegebenen Fermentationsbedingungen nur in Spuren gebildet.

Biotransformation von Epothilon A und B zu Epothilon E und F:

Für die gezielte Biotransformation wird eine 4 Tage alte, mit Adsorberharz gehaltene 500 ml Kultur von So ce90 verwendet. Von dieser werden 250 ml unter Zurücklassen des XAD in einen sterilen 1 l Erlenmeyerkolben überführt. Danach wird eine methanolische Lsg. einer Mischung von insgesamt 50 mg Epothilon A + B zugegeben und der Kolben für 2 Tage bei 30 °C und 200

Upm auf einer Schütteltruhe inkubiert. Die Bildung der Epothilone E und F wird direkt aus 10 µl des zentrifugierten Kulturüberstand analysiert (Abb. 2). Die Umwandlung erfolgt nur in Gegenwart der Zellen und ist abhängig von der eingesetzten Zelldichte und der Zeit. Eine Kinetik der Umwandlung ist für Epothilon A in Abb. 3 dargestellt.

Isolierung von Epothilon E und F

Zur Isolierung von Epothilon E und F werden 3 Schüttelkolbenansätze aus der Biotransformation (s.o.) vereinigt und 1 h mit 20 ml XAD-16 geschüttelt. Das XAD wird durch Absieben gewonnen und mit 200 ml Methanol eluiert. Das Eluat wird i. Vak. zu 1.7 g Rohextrakt eingedampft. Dieser wird zwischen 30 ml Ethylacetat und 100 ml Wasser verteilt. Aus der Ethylacetatphase werden beim Eindampfen i. Vak. 330 mg eines öligen Rückstandes erhalten, die in 5 Läufen über eine 250 x 20 mm RP-18 Säule chromatographiert werden (Laufmittel: Methanol/Wasser 58:42, Detektion 254 nm).

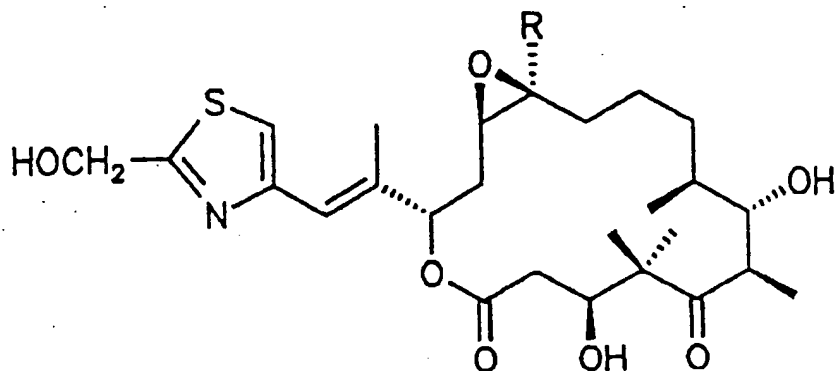
Ausbeute: Epothilon E	50 mg
F	10 mg

Biologische Wirkung von Epothilon E:

In Zellkulturen wurde die Konzentration bestimmt, welche das Wachstum um 50 % reduziert (IC_{50}) und mit den Werten für Epothilon A verglichen.

Zelllinie

	<u>IC_{50} (ng/ml)</u>	
	<u>Epothilon E</u>	<u>Epothilon A</u>
HeLa, KB-3.1 (human)	5	1
Mausfibroblasten, L929	20	4



Epothilone E R = H

Epothilone F R = CH₃

EPOTHILON E

$C_{26}H_{39}NO_7S$ [509]

ESI-MS: (positiv Ionen): 510.3 für $[M+H]^+$

DC: $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: $R_t = 5,0$ min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250x4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

Fluß: 1.2 ml/min

Detektion: Diodenarray

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 2.38$ (2- H_a), 2.51 (2- H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-II), 7.4 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- H_a), 2.07 (14- H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.32 (23- H_3), 1.17 (24- H_3), 0.97 (25- H_3), 2.04 (27- H_3)

EPOTHILON F

$C_{27}H_{41}NO_7S$ [523]

ESI-MS: (positiv Ionen): 524.5 für $[M+H]^+$

DC: $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

IPLC: $R_t = 5.4$ min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250x4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

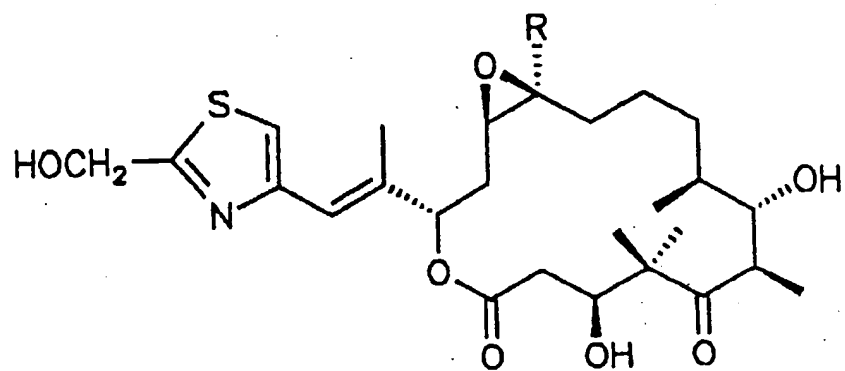
Fluß: 1,2 ml/min

Detektion: Diodenarray

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 2.37$ (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-II), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14- H_a), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3).

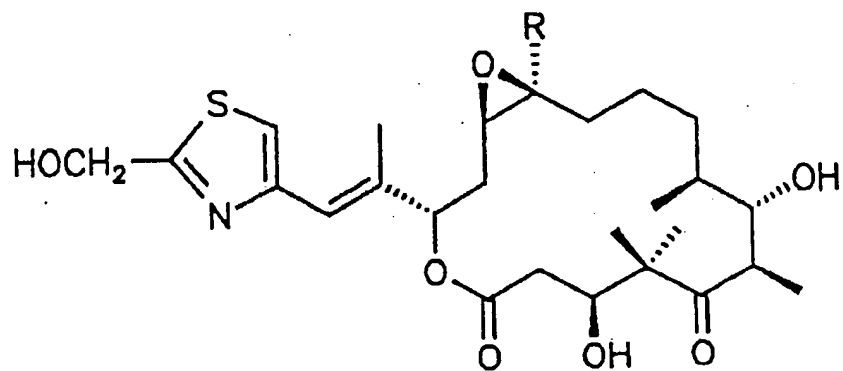
Patentansprüche

1.



Epothilon E R = H

2.



Epothilon F R = CH₃

Abb. 1 HPLC Analyse eines XAD Eluates am Ende einer Fermentation.

1/2

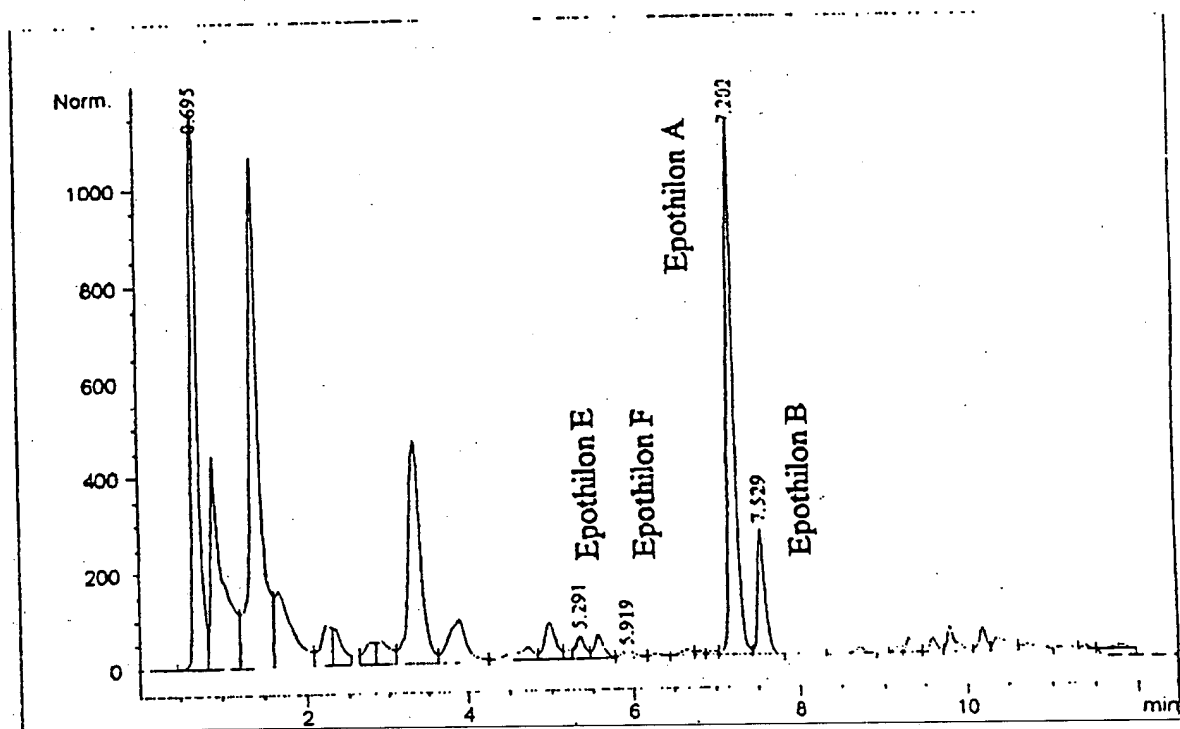


Abb. 2 Anreicherung von Epothilon E und F in einer Fermentationsbrühe nach Zufütterung eines Gemisches aus Epothilon A und B, analysiert nach 48 Stunden Inkubation.

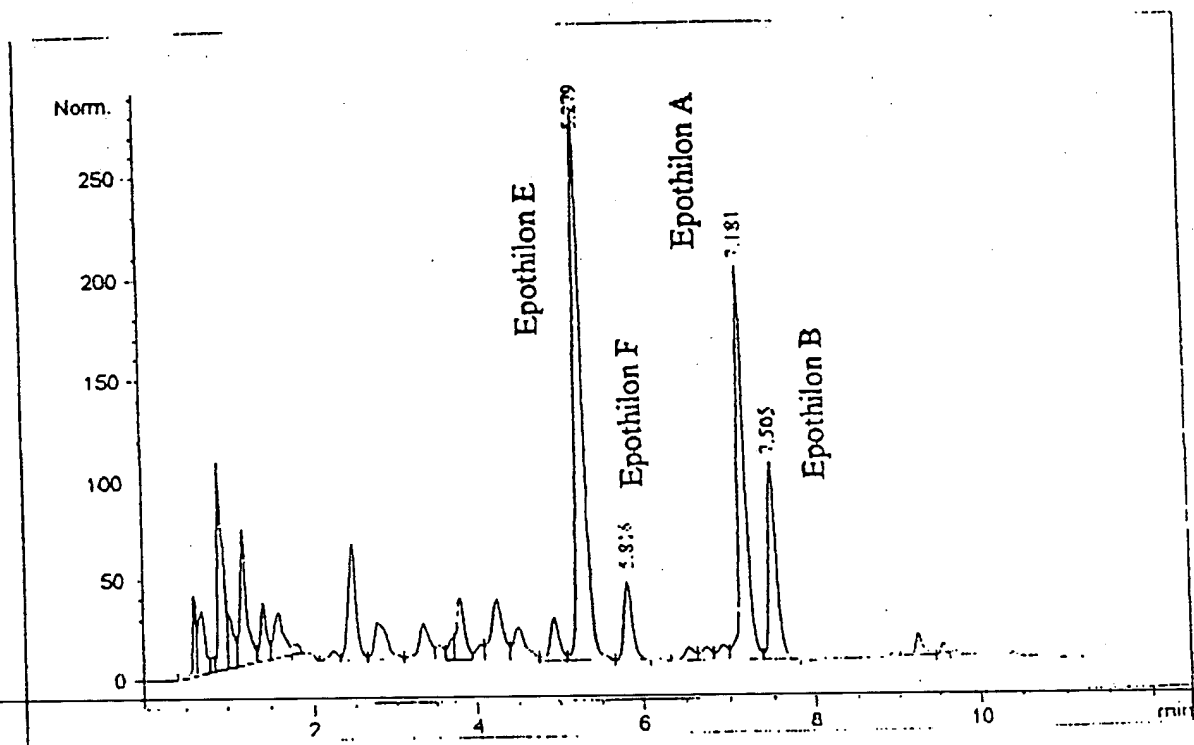
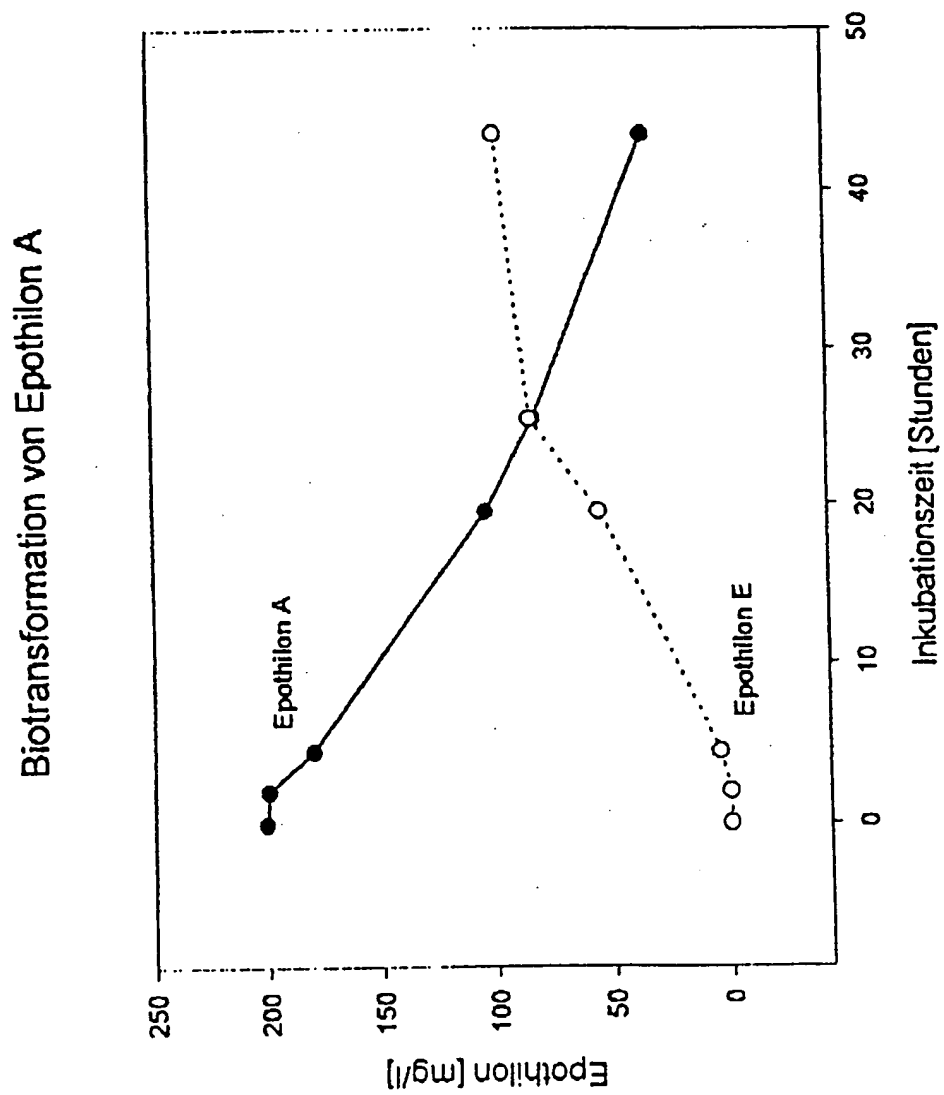


Abb. 3 Kinetik der Biotransformation von Epothilon A zu Epothilon E durch *Sorangium cellulosum* So ce90.



[stamp] PCT/EP97/06442

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

[seal]

PRIORITY DOCUMENT

[stamp] Received March 11, 1998
WIPO PCT

Certification

On February 25, 1997, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) [Society for Biotechnological Research mbH (GBF)] in Braunschweig, Germany submitted a patent application with the title

"Epothilione [sic; Epothilones] E and F"

to the German Patent Office.

The attached pages constitute a correct and accurate reproduction of the original documents of this patent application.

This patent application has been assigned the International Patent Classifications C 07 D, C 12 P and A 61 K on a provisional basis by the German Patent Office.

Munich January 13, 1998

The President of the German Patent Office

By Order

[signature]

Hoiss

Application No.: 197 07 506.1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Epothilones E and F

Production strain:

The production strain *Sorangium cellulosum* So ce90 was isolated in July of 1985 at the GBF from a soil sample taken from the beaches of Zambesi and was deposited on October 28, 1991 with the German Collection for Microorganisms (DSM) under the number DSM 6773.

The characterization of the producing strain and the culture conditions are described by *G. Höfle, N. Bedorf, K. Gerth and H. Reichenbach*: Epothilones, Their Synthesis Processes and Agents Containing Them, German Patent Application 41 38042 A1, published on May 27, 1993.

Formation of epothilones E and E [sic; F] during fermentation:

A typical fermentation process takes place as follows: A 100 L bioreactor is filled with 60 L of medium (0.8% starch, 0.2% glucose, 0.2% soybean meal, 0.2% yeast extract, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L Fe-EDTA, pH 7.4). In addition 2% adsorber resin (XAD-16, Rohm and Haas) is added. The medium is sterilized by autoclaving (2 hours, 120°C). Then it is inoculated with 10 L of a preculture grown in the same medium (plus 50 mM HEPES buffer, pH 7.4) in agitated flasks (160 rpm, 30°C). This mixture is fermented at 32°C at a stirrer speed of 500 rpm with an aeration of 0.2 L[STP]/m³ · h, while keeping the pH at 7.4 by adding KOH. The fermentation will continue for 7 to 10 days. The epothilones thus formed are bound continuously to the adsorber resin during fermentation. After separating the culture medium (e.g., by screening in a process filter), the resin is washed with three bed volumes of water and eluted with four bed volumes of methanol. The eluate is concentrated until dry and placed in 700 mL of methanol.

HPLC analysis of the XAD eluate:

The eluate is concentrated 100:1 in relation to the starting volume of the reactor (70 L). The analysis is performed using a Hewlett Packard HPLC 1090 system. To separate the constituents, a Microbore column (125/2 Nucleosil 120-5 C₁₈) from Machery Nagel (Düren) is used. Elution is performed with a gradient of water/acetonitrile from 75:25 initially to 50:50 after 5.5 minutes. This ratio is maintained until minute 7, and then increased to 100% by minute 10.

The measurement is performed at a wavelength of 250 nm and a bandwidth of 4 nm. The diode array spectra are measured in a wavelength range from 200 to 400 nm. The XAD eluate contains two new substances with $R_f = 5.29$ and $R_f = 5.91$ whose absorption spectra are identical to those of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

epothilones A and B, respectively (Figure 1; E corresponds to A, F corresponds to B). These substances are formed only in traces under the stated fermentation conditions.

Biotransformation of epothilones A and B to epothilones E and F:

For controlled biotransformation, a four-day-old 500 mL culture of *S. cerevisiae* bound to adsorber resin is used. Of this culture, 250 mL is transferred to a sterile 1 L Erlenmeyer flask, leaving the XAD. Then a methanolic solution of a mixture of a total of 50 mg epothilone A + B is added and the flask is incubated on an agitator for 2 days at 30°C and 200 rpm. Formation of epothilones E and F is analyzed directly from 10 µL of the centrifuged culture supernatant (Figure 2). The biotransformation is performed only in the presence of the cells and depends on the cell density and time. Figure 3 shows the kinetics of this transformation for epothilone A.

Isolation of epothilones E and F:

To isolate epothilones E and F, three agitated flask batches from biotransformation (see above) were combined and agitated for one hour with 20 mL XAD-16. The XAD was recovered by screening and eluted with 200 mL methanol. The eluate was evaporated *in vacuo* to yield 1.7 g crude extract, which was distributed between 30 mL ethyl acetate and 100 mL water. By evaporating *in vacuo*, 330 mg of an oily residue was obtained from the ethyl acetate phase and chromatographed in five runs over a 250 × 20 mm RP-18 column (solvent: methanol/water 58:42, detection at 254 nm).

Yield: Epothilone E 50 mg

Epothilone F 10 mg

Biological effect of epothilone E:

In cell cultures, the concentration which would reduce growth by 50% (IC₅₀) is determined and compared with the values for epothilone A.

<u>Cell line</u>	<u>IC₅₀ (ng/mL)</u>	
	<u>Epothilone E</u>	<u>Epothilone A</u>
HeLa, KB-3.1 (human)	5	1
Mouse fibroblasts, L929	20	4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[insert formula]

Epothilone E R = H

Epothilone F R = CH₃

EPOTHILONE E

C₂₆H₃₉NO₇S [509]

ESI-MS: (positive ions): 510.3 for [M+H]⁺

TLC: R_f = 0.58

TLC aluminum film 60 F 254 Merck. Solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinction at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray color when heated to 120°C

HPLC: R_f = 5.0 min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μm, 250 × 4 mm

Solvent: Methanol/water = 60:40

Flow rate: 1.2 mL/min

Detection: Diode array

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.38 (2-H_a), 2.51 (2-H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30-1.70 (8-H, 9-H₂, 10-H₂, 11-H₂), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14-H_a), 2.07 (14-H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21-H₂), 1.05 (22-H₃), 1.32 (23-H₃), 1.17 (24-H₃), 0.97 (25-H₃), 2.04 (27-H₃)

EPOTHILONE F

C₂₇H₄₁NO₇S [523]

ESI-MS: (positive ions): 524.5 for [M+H]⁺

TLC: R_f = 0.58

TLC aluminum film 60 F 254 Merck. Solvent: dichloromethane/methanol = 9:1

Detection: UV extinction at 254 nm. Spraying with vanillin-sulfuric acid reagent, blue-gray color when heated to 120°C.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

HPLC: $R_f = 5.4$ min

Column: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 250 \times 4 mm

Solvent: Methanol/water = 60:40

Flow rate: 1.2 mL/min

Detection: Diode array

^1H -NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.37$ (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30-1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14- H_a), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent Claims

1.

[insert formula]

Epothilone E R = H

2.

[insert formula]

Epothilone F R = CH₃

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 1. HPLC analysis of an XAD eluate at the end of fermentation.

[see source for graph]

Epothilone E; Epothilone F; Epothilone A; Epothilone B

Figure 2. Enrichment of epothilones E and F in a fermentation medium after adding a mixture of epothilones A and B, analyzed after incubation for 48 hours.

[see source for graph]

Epothilone E; Epothilone F; Epothilone A; Epothilone B

Figure 3. Kinetics of biotransformation of epothilone A to epothilone E by *Sorangium cellulosum* So ce90.

Biotransformation of epothilone A

[see source for graph]

[ordinate] Epothilone (mg/L); [abscissa] Incubation time (hours); Epothilone A; Epothilone E

THIS PAGE BLANK (USPTO)